

**Vector for liver-specific gene therapy**

**Patent number:** DE4407859  
**Publication date:** 1995-03-02  
**Inventor:** HOFMANN CHRISTIAN (DE); SANDIG VOLKER DR (DE); STRAUSS MICHAEL DR (DE)  
**Applicant:** MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE)  
**Classification:**  
- **international:** C12N15/63; C12N7/01; C12N15/12  
- **european:** C12N15/866  
**Application number:** DE19944407859 19940304  
**Priority number(s):** DE19944407859 19940304

**Also published as:**

WO9523866 (A1)  
EP0746624 (A1)  
EP0746624 (B1)

**Report a data error here**

**Abstract of DE4407859**

The invention relates to a vector for liver-specific gene therapy. The fields of application are medicine and gene technology. The aim of the invention is the construction of a vector which finds liver cells highly specifically, is effectively absorbed by said cells and can also accept several or very large therapeutic genes. The vector is to be usable in human gene therapy. The vector of the invention consists of an insect virus, preferably a representative of the baculo-viruses or a nuclear polyhedrosis virus, containing the components: a therapeutic DNA sequence, a promoter suitable for gene expression in the liver and possibly an establishment sequence.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEUTSCHES  
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 44 07 859.5-41  
22 Anmeldetag: 4. 3. 94  
43 Offenlegungstag: —  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 2. 3. 95

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V. Berlin, 80539 München, DE

72 Erfinder:

Hofmann, Christian, 13125 Berlin, DE; Sandig,  
Volker, Dr., 13125 Berlin, DE; Strauss, Michael, Dr.,  
13187 Berlin, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, VOL. 88, S. 8850 - 8854,  
Okt. 1991;

54 Vektor für die leberspezifische Gentherapie

57 Die Erfindung betrifft einen Vektor für die leberspezifische  
Gentherapie; Anwendungsgebiete sind die Medizin und die  
Gentechnik.

Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Vektors, der  
Leberzellen hochspezifisch findet, von den Zellen effektiv  
aufgenommen wird und auch mehrere bzw. sehr große  
therapeutische Gene aufnehmen kann. Der Vektor soll für  
die Gentherapie beim Menschen einsetzbar sein.

Der erfindungsgemäße Vektor besteht aus einem Insektenvi-  
rus, vorzugsweise einem Vertreter der Baculoviren oder  
einem nuklearen Polyhedrosis-Virus, welches die Kompo-  
nenten

- eine therapeutische DNA-Sequenz,
- einen für die Genexpression in der Leber geeigneten  
Promotor
- und ggf. eine Etablierungssequenz  
enthält.

DE 44 07 859 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Vektor für die leberspezifische Gentherapie, Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik.

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Methoden und Vektoren für die Gentherapie entwickelt worden (Übersicht in Mulligan/1993/Science 260, 926). Dabei werden viele Vektoren, vor allem solche, die von Retroviren oder Adenoviren abgeleitet sind, favorisiert. Beide Virus-Vektortypen sind relativ breit anwendbar, wobei retrovirale Vektoren nur bei teilungsfähigen Zellen effektiv sind und Adenoviren auch bei ruhenden Zellen funktionieren. Beide Vektortypen sind zwar für die Genübertragung in Leberzellen (Hepatozyten) in vitro geeignet, können aber für eine in vivo Anwendung zur Gentherapie beim Menschen kaum in Betracht gezogen werden. Während für die Anwendung retroviraler Vektoren eine Leberteilektomie zur Stimulierung von Zellteilung (Regeneration) erforderlich wird, ist der adenovirale Gentransfer nicht sehr stabil (keine Integration in das Genom).

Alternative Vektoren mit potentieller Anwendbarkeit für den Lebergentransfer basieren auf Liposomen oder auch auf Multikomponenten-Partikeln mit Proteindomänen, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren der Leber (z. B. Asialoglykoprotein-Rezeptor) binden und durch deren Internalisierung in die Zelle aufgenommen werden können (Übersicht in: Versland et al/1992/Seminars in Liver Disease 12, 332). Ein wesentlicher Nachteil dieser Vektoren besteht in der Aufnahme über den endozytotischen Weg der zu einer Degradation eines großen Teils der Vektoren und ihrer DNA in den Endosomen führt, so daß nur wenig funktionsfähige DNA den Zellkern erreichen kann.

Eine Lösung für dieses Problem wurde zwar für die in vitro Anwendung gefunden; diese ist aber nicht auf die Situation in vivo (am Patienten) anwendbar. Sie basiert auf der gleichzeitigen Infektion der Zielzellen mit Adenovirus, was zur Auflösung der Endosomen und Freisetzung von Vektor (DNA) führt (Curiel, D. T., Agrawal, S., Wagner, E. und Cotten, M./1991, PNAS 88, 8850—8854).

In P 43 39 922.3 wurde vorgeschlagen, ein an einen Promoter gekoppeltes therapeutisches Gen, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist, mit einer Peptidhülle zu verpacken und an Komponenten des Hepatitis B-Virus zu koppeln. Damit wurde eine wichtige Voraussetzung für eine Therapie genetischer Erkrankungen der Leber geschaffen.

Ziel der Erfindung ist die Konstruktion eines Vektors, der Leberzellen in vivo hochspezifisch findet, von den Zellen effektiv aufgenommen wird und auch mehrere bzw. sehr große therapeutische Gene aufnehmen kann. Der Vektor soll für die Gentherapie beim Menschen einsetzbar sein.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1 und 9 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Der wesentliche Bestandteil des erfindungsgemäßen Vektors ist ein Insektenvirus, vorzugsweise ein Vertreter der Baculoviren oder ein nukleares Polyhedrosis-Virus. Dieses Insektenvirus enthält

- eine oder mehrere therapeutische DNA-Sequenzen
- einen für die Genexpression in der Leber geeigneten Promotor
- und ggf. eine Etablierungssequenz.

Die bevorzugt eingesetzten Baculoviren gehören zu einer Familie großer DNA-Viren, deren Wirtsspektrum natürlicherweise ausschließlich auf Arthropoden beschränkt ist. Ihr Genom (80 kbp—200 kbp) ist in flexible Nukleokapside verpackt, die die Insertion großer Fremd-DNA ermöglicht. Die ausgesprochene Wirtsspezifität der Baculoviren nahm man als Grundlage für ihren Einsatz in der biologischen Schädlingsbekämpfung, als man erkannte, daß durch den Einsatz chemischer Insektizide auch potentielle Gefahren für Mensch und Umwelt hervorgerufen werden können.

Eine Voraussetzung für diesen Einsatz besteht darin, daß eine Expression von Baculovirusgenen in menschlichen Zellen nicht stattfindet. In der Tat wurde bei Untersuchungen an zahlreichen humanen Zelltypen festgestellt, daß bei der Behandlung mit Baculoviren keine signifikanten Infektionen eintreten.

Als therapeutische DNA-Sequenz für den erfindungsgemäßen Vektor wird die cDNA eines Gens verwendet, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist, d. h. fehlt oder durch Mutation verändert ist. Beispiele für solche Gene sind das LDL-Rezeptor-Gen, das Gen für das Alpha-1-Antitrypsin, für die Blutgerinnungsfaktoren VIII und IX, für Erythropoetin oder für Thymidinkinase. Man kann auch einen Teil einer genomischen Sequenz einsetzen, die eine Mutation im Zielgen überspannt und mit dieser homolog rekombinieren kann.

Als Promotoren dienen in erster Linie starke virale Promotoren, vorzugsweise der sehr frühe Promotor des Cytomegalievirus (CMV). Ebenfalls in Betracht kommen leberspezifische Promotoren, bevorzugt Promoter/Enhancer des Hepatitis B-Virus wie z. B. die Kombination core-Promoter/enhancer II. Sie sind neben ihrer Spezifität auch klein genug, um leicht in einen Expressionsvektor eingebaut werden zu können. Auch in Betracht für die Konstruktion des erfindungsgemäßen Vektors kommen Promotoren leberspezifischer Gene wie Albumin, PEPCK (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) oder OTC (Ornithintranscarbamylase).

Die Etablierungssequenz hat die Aufgabe, für eine Stabilisierung des Vektors in der Zelle ohne Integration in das Genom zu sorgen. Sie wird besonders in den Fällen verwendet, wenn eine Langzeitexpression erforderlich ist. Bevorzugte Etablierungssequenzen gemäß der Erfindung sind virale Kernetablierungssequenzen, wie die des Epstein-Barr-Virus, oder autonome Replikationssequenzen aus dem Säuger-genom.

Die Herstellung der neuen Vektoren erfolgt in den folgenden wesentlichen Schritten

- Klonierung der therapeutischen DNA-Sequenz zusammen mit dem Promoter in einem Rekombinationsvektor
- ggf. Einfügung einer Etablierungssequenz vor oder nach der Klonierung

- Transfektion des erhaltenen Konstrukts gemeinsam mit der DNA eines Insektenvirus in Insektenzellen und
- Gewinnung des in den Insektenzellen verpackten Vektors aus dem Überstand der Insektenzellkultur.

Durch die Erfindung wird ein neuartiger Vektor für den leberspezifischen Gentransfer geschaffen, der gegenüber den bisher entwickelten Virusvektoren auf der Basis von Retroviren oder Adenoviren erhebliche Vorteile bietet. Dazu gehören die Leberspezifität, die fast unbegrenzte Möglichkeit, Fremd-DNA einzubauen, die Infektion nicht teilungsfähiger Zellen, die fehlende Cytotoxizität und die einfache Generierung hochtitriger rekombinanter Viren.

Es ist besonders überraschend, daß der Vektor hochspezifisch Hepatozyten infiziert. Er ermöglicht, ein gewünschtes Gen in die Leber eines Patienten einzuführen und seinen Weg zum Funktionsort optimal zu gestalten. Das erfolgt beispielsweise dadurch, daß der Vektor konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über die Portalvene der Leber, verabreicht wird. Dadurch wird eine wesentliche Voraussetzung für eine Therapie genetischer Erkrankungen der Leber geschaffen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

#### Ausführungsbeispiel

#### Baculovirusvektor für Luziferaseexpression in Hepatozyten

##### 1. Konstruktion des Baculovirustransfervektors

1.1. Das PvuII-Fragment des pCMV-Luci (Müller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2945 (1994)) enthält den Cytomegalieviruspromoter, das Luciferasereportergen und das CMV-Polyadenylierungssignal als Expressionskassette. Es wird in die SmaI Schnittstelle des pVL 1392 kloniert. Das über eine Quiagensäule gereinigte Plasmid (pVL-CMV-Luci) wird für die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus verwendet.

1.2. Durch BamHI-HindIII-Restriktion und Endenauffüllung durch Klenow-Enzym aus dem Plasmid T7-Iol (Dissertation A. Lieber und V. Sandig) erhält man das Luciferasegen. Nach Klonierung in die SmaI-Schnittstelle des pVL-1392 steht es unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors (pVL-PP-Luci). Dieses Konstrukt dient als Negativkontrolle, um den Einfluß des Säugerpromotors bei der Hepatozyteninfektion zu verdeutlichen.

1.3. Das Luciferasegen wird in analogen Konstrukten durch therapeutische Gene, wie z. B. das LDL-Rezeptorgen ersetzt. Anstelle des CMV-Promotor kann ein leberspezifischer Säugerpromotor (Hepatitis) verwendet werden. Die die Expressionskassette flankierenden Polyhedrinsequenzen können auch durch andere nicht essentielle Baculovirussequenzen (z. B. p94) ausgetauscht werden.

##### 2. Herstellung rekombinanter Viren

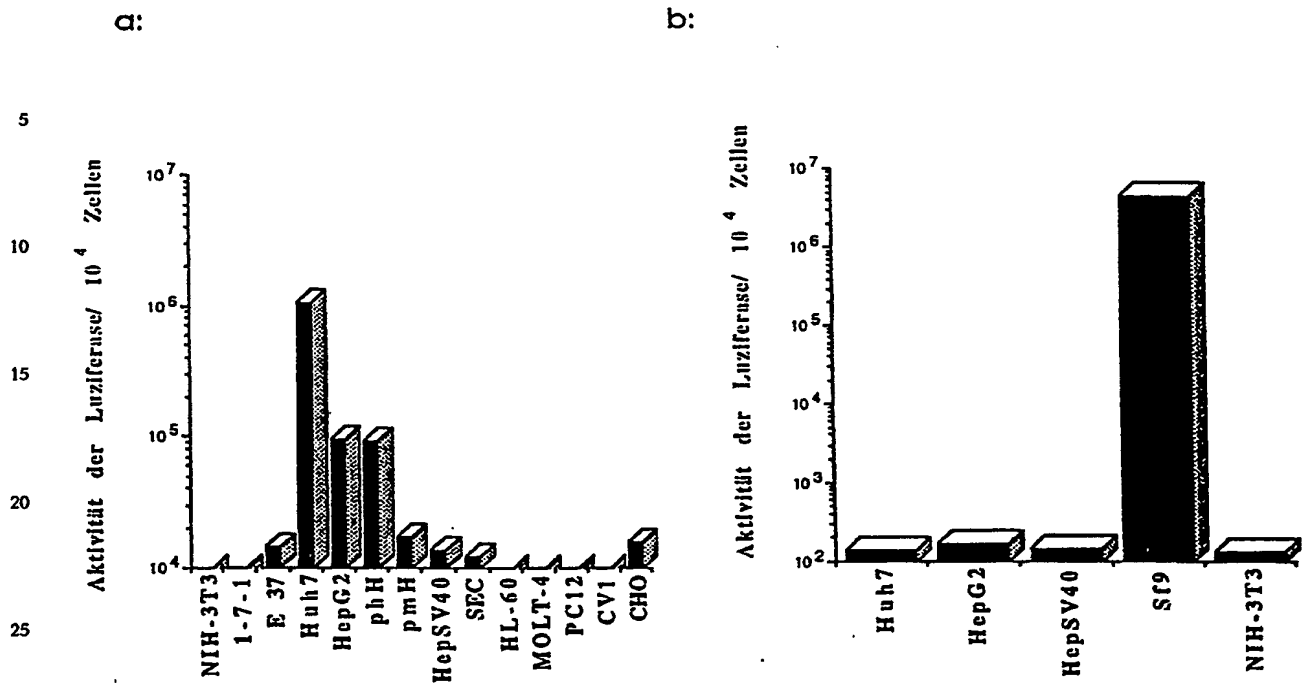
3 µg pVL-CMV-Luci bzw. pVL-PP-Luci und je 0,5 µg Baculovirus-Wildtyp-DNA (Baculo-Gold, PharMingen) werden mittels Lipofektion (BRL) in 2 Millionen *Spodoptera frugiperda*-Insektenzellen (Sf9, ATCC) kotransfiziert. Durch homologe Rekombination, vermittelt durch die Polyhedrin-Sequenzen der Transfervektoren, entstehen rekombinante Baculoviren (Bac-CMV-Luci, Bac-PP-Luci), die das Luciferase-Gen unter Kontrolle des CMV- bzw. Polyhedrinpromotors tragen.

##### 3. Vermehrung und Reinigung der rekombinanten Baculoviren

Sf9-Insektenzellen werden in Flaschen- oder Spinnerkultur mit einer MOI von 1 drei Tage lang mit dem Bac-CMV-Luci bzw. Bac-PP-Luci infiziert. Die jeweils entstehenden Viren werden durch Zentrifugation von den Insektenzellen abgetrennt und anschließend pelletiert (12 000 g, 45 min). Durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (Gradient 24—62%) erhält man nach 4 h bei 100 000 g eine Bande gereinigten Virus, die durch zweimaliges Pelletieren in den Applikationspuffer (isotonische Kochsalzlösung, resp. Zellkulturmedium) überführt wird.

##### 4. Versuche zur Spezifität der Infektion bzw. Luziferaseexpression des Bac-CMV-Luci in Leberzellen

Um die Zellspezifität der Baculovirusinfektion zu untersuchen, werden Säugerzelllinien verschiedenster Gewebe und Spezies und primäre humane (phH) sowie primäre murine (pmH) Hepatozyten mit Bac-CMV-Luci bzw. Bac-PP-Luci infiziert (MOI 100). Nach 1,5 Tagen wird die Luciferaseexpression gemessen. Das Ergebnis der Luciferaseexpressionswerte zeigt die Spezifität des Bac-CMV-Luci in Bezug auf die Hepatozyteninfektion. Das Luciferasegen unter dem Polyhedrinpromotor (b: Bac-PP-Luci Infektion verschiedener Zelllinien) ist ausschließlich in Insektenzellen aktiv.



**Abb. 1:**  $10^4$  Zellen wurden in 50  $\mu$ l Lysepuffer (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,8; 1% Triton X-100; 1 mM DTT) lysiert und in 180  $\mu$ l Reaktionspuffer (25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,8; 4 mM EGTA pH 8; 15 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 1 mM DTT; 1 mM ATP) in einem berthold lumat (20 mM Luciferin) gemessen.

a: Infektion mit Bac-CMV-Luci

b: Infektion mit Bac-PP-Luci

#### 5. Hinweise auf eine Proteinrezeptorvermittelte Endozytose des Baculovirus in Hepatozyten (Huh7)

Proteasebehandlung der Hepatozyten verringern die Proteinrezeptorzahl, so daß eine Reduktion der Luziferaseaktivität nach Bac-CMV-Luci Infektion eintritt:

Enzyme	Konzentration	% Reduktion der Luziferaseaktivität
Trypsin	2mg/ml	50.4
Papain	1mg/ml	36.9
Pronase E	1mg/ml	52.6

**Abb. 2:** Huh7-Zellen wurden 15 min mit den angegebenen Proteasen behandelt und nach deren Inaktivierung mit Bac-CMV-Luci (MOI 100) 1 h lang infiziert. Analog wurden Huh7-Zellen 3 h nach der 1stündigen Virusinfektion behandelt (Referenzwert 100%). Die Reduktion der Luziferaseaktivität (Messung nach 1,5 d) ergibt sich aus dem Luziferasewert der vorher proteasebehandelten Hepatozyten zu dem Referenzwert.

Chloroquin und Colchizin greifen in den Endozytoseweg des Virus bzw. seiner Wanderung in den Hepatozytenkern ein. Die Applikation beider Chemikalien verringert ebenfalls die Luziferaseaktivität.

Chloroquin	Konzentration	% Reduktion der Luziferaseaktivität
	0.5 mM	100
	0.1 mM	98.4
	0.03 mM	92
	0.01 mM	81
Colchizin	18 mg/ml	69.4
	6 mg/ml	56
	2 mg/ml	55

Abb. 3: Huh7-Zellen wurden mit Bac-CMV-Luci (MOI 100) ei gleichzeitiger Zugabe von Chloroquin bzw. Colchizin infiziert. Die Reduktion der Luziferaseaktivität bezieht sich auf einen Referenzwert, bei dem die beiden Chemikalien jeweils 12 h nach Infektion gegeben wurden. Die Expression der Luziferase wurde nach 1,5 Tagen gemessen.

#### Patentansprüche

1. Vektor für die leberspezifische Gentherapie, bestehend aus
  - einem Insektenvirus,
  - welches die Komponenten
  - eine therapeutische DNA-Sequenz,
  - einen für die Genexpression in der Leber geeigneten Promotor
  - und ggf. eine Etablierungssequenz enthält.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Insektenvirus Baculovirus verwendet wird.
3. Vektor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Insektenvirus nukleares Polyhedrosis-Virus verwendet wird.
4. Vektor nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutische DNA-Sequenz die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit defekt ist.
5. Vektor nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutische DNA-Sequenz ein Teil einer geomischen Sequenz, die eine Mutation im Zielgen überspannt und mit dieser homolog rekombinieren kann, verwendet wird.
6. Vektor nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutisches Gen die cDNA für den LDL-Rezeptor, für alpha-1-Antitrypsin, für die Blutgerinnungsfaktoren VIII und IX, für Erythropoetin oder für Thymidinkinase verwendet wird.
7. Vektor nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Promoter ein starker viraler, vorzugsweise der sehr frühe Promoter des Cytomegalievirus (CMV) oder ein leberspezifischer Promoter, vorzugsweise der des Hepatitis B-Virus, oder ein leberspezifischer Säugerpromotor, vorzugsweise der des Albumingens, verwendet wird.
8. Vektor nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Etablierungssequenz eine virale Kerneta-blierungssequenz, wie die des Epstein-Barr Virus, oder eine autonome Replikationssequenz verwendet wird.
9. Verfahren zur Herstellung des Vektors nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeu-tische DNA-Sequenz zusammen mit dem Promoter in einen Rekombinationsvektor kloniert wird, ggf. vor oder nach dieser Klonierung eine Etablierungssequenz eingefügt wird, das erhaltene Konstrukt gemeinsam mit der DNA eines Insektenvirus in Insektenzellen transfiziert und der in den Insektenzellen verpackte Vektor aus dem Überstand der Insektenzellkultur gewonnen wird.

- Leerseite -